

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年7月5日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/48019 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>:  
15/06, G01N 33/53, 33/573

C07K 16/18, C12N

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP00/09251

(22) 国際出願日: 2000年12月26日 (26.12.2000)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/373677  
1999年12月28日 (28.12.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 黒川  
清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都  
新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo (JP).

(71) 出願人および

(72) 発明者: 宮田敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-  
1132 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊  
勢原102号 Kanagawa (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイド」を参照。

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING MESANGIUM PROLIFERATIVE NEPHRITIS IN RAT

(54) 発明の名称: ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断方法

(57) Abstract: A method of diagnosing mesangium proliferative nephritis in rat with the use of megsin protein in a biological sample as an indication; and an antibody and an immunoassay reagent which are useful in assaying rat megsin protein in a biological sample.

(57) 要約:

本発明は、生体試料中のメグシンタンパク質を指標とする、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断方法を提供する。また本発明は、生体試料中のラット・メグシンタンパク質の測定に有用な抗体や免疫学的測定用試薬を提供する。

WO 01/48019 A1

- 1 -

## 明細書

### ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断方法

#### 技術分野

本発明はラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断方法と、この方法に有用なラットのメグシンを認識する抗体、並びにその用途に関する。

#### 背景技術

腎臓の血液濾過作用や解毒作用が全く機能しない末期腎不全においては、腎移植が唯一の治療手段であるが、我が国においては、移植腎の供給体制が十分に整備されているとは言い難い。また、移植療法自体に対する社会的認知も進んでいないことなどから、腎代用療法としては透析療法に頼らざるを得ないのが現状である。

現在、日本の透析患者は推定約 17 万人を数える。一人当たりの平均的な治療費は年間約 600 万円を必要とし、医療保険制度を圧迫する大きな原因の一つとされている。また、毎週 2 ~ 3 日、1 日 4 ~ 6 時間を透析治療のために拘束されることから、患者本人の社会活動も大きく妨げられることになる。

腎不全は、腎疾患患者が最終的に至る病態である。その原因や経歴は一様ではなく、薬物中毒、感染症、悪性腫瘍、糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）などの本来腎臓以外の病変により、腎障害が発症し、腎不全に至る場合も数多くみられる。

腎障害においては、末期即ち腎不全近くになるまで顕著な自覚症状が現れないことから、その発生が見過ごされ易く、発症した時点では既に腎臓は回復不可能なダメージを受けている場合が多い。従って、自覚症状の発現をみる前に、でき

る限り初期の段階で腎障害を発見することが、腎不全への移行を防ぐために、また、透析治療による保険財政圧迫を避けるためにも大切である。

従来、腎障害を診断する手がかりとして、いわゆる検尿による尿タンパクや尿沈渣の検査が広く行われている。しかし、尿タンパクは健常人でも過激な運動、精神的ストレス、多量の肉食、月経前などで一過性に増加する。また、若年者に多くみられる（健常人の0.5%程度）起立性タンパク尿など、腎疾患に由来しない尿タンパクもある。さらに尿路疾患、膀胱疾患、女性性器疾患などでも尿タンパクが認められる。従って、尿タンパクの検査のみで腎障害を確定診断することは困難である。

尿沈渣は、尿を遠心分離し、その沈渣を顕微鏡で観察するものであるが、赤血球沈渣は健常人でもみられ、腎障害以外の尿路系関連臓器に由来する場合もあるので、これもまた腎障害の確定診断には不十分である。

また、糖尿病性腎症の診断の指標として尿中に漏洩したアルブミンを定量し、健常人の正常値と比較して早期の糖尿病性腎症を特定する方法が知られている。しかし、尿中のアルブミン量は健常人においても変動することから、糖尿病性腎症の正確な病態を把握することはできない。

さらに、尿成分の血中停滞を検査する目的で血清クレアチニン（Cr）、血中尿素窒素（BUN）の測定なども行われるが、これらの検査も食事の影響を受けやすい。このように、尿タンパクや血清Cr、BUNの検査において異常値が顕れても、それが必ずしも腎障害に由来するものとは限らず、健常人や他の疾患でもしばしば異常値が発現する。

他に、尿中 $\beta_2$ -ミクログロブリン、N-アセチルグルコサミニダーゼ（NAG）、IgG、トランスフェリン、あるいはインターロイキン-6など様々な物質の測定による腎障害の診断が試みられているが、腎障害の重症度と一致しない場合も多く、いずれも有効でない。

また、これら血液成分を尿中で測定する方法については、腎全体の障害または免疫反応の関与を推測することは可能であるが、腎組織内の障害部位を特定することは困難である。そして、上記に列記した手段以外には、腎障害の診断および重症度の判定に充分な感度および特異性を有する検査方法はまだ知られていない。現在のところ、腎障害の診断や重症度の最終的判定には、腎生検による組織学的診断が不可欠とされている。

しかしながら、腎生検は侵襲的検査であり、出血、感染などの合併症の危険性が常に伴う。また、検査を実施するためには、専門医と設備の整った施設に入院しなければならず、患者への肉体的、社会的負担は無視できない。

以上のように、検尿による検査は簡便で、且つ、多量の検体を処理できる優れた検査方法ではあるが、腎障害の確定診断という観点からは満足できるものではない。一方、腎生検は、腎障害の診断、重症度の判定は確実であるものの、その利用は極く限られたものとならざるを得ない。このような背景から検尿の簡便さと、腎生検の正確さを兼ね備えた腎障害の診断方法が望まれていた。

さて、腎に限らず特定の組織に特異的に発現しているタンパク質は、しばしばその臓器の機能障害の指標として用いられる。たとえば、LDHや $\gamma$ GTPといった酵素タンパク質は、肝機能マーカーとして広く利用されている。しかし腎においては、その機能の指標となるような腎に特異的なタンパク質の存在は知られていない。

ところで、本発明者は、大規模DNA配列決定およびデータベース解析により、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、メグシンと命名した遺伝子を単離している。そして、メグシンの全長cDNAクローニングがコードする380個のアミノ酸からなる新規タンパク質であるメグシンタンパク質を取得することに成功した。更に、Swiss Protデータベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、ヒトメグシンタンパク質が、SERPIN (セリンプロテアーゼインヒビター) スーパーファミリー (R.

Carrell et al., Trends Biochem. Sci., 第 10 卷, 20 頁, 1985 年; R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 第 52 卷, 527 頁, 1987 年; E. K.O. Kruithof et al., Blood, 第 86 卷, 4007 頁, 1995 年; J. Potempa et al., J. Biol. Chem., 第 269 卷, 15957 頁, 1994 年; E. Remold-O'Donnell, FEBS Let., 第 315 卷, 105 頁, 1993 年) に属するタンパク質であることを見出した (T. Miyata et al., J. Clin. Invest., 第 120 卷, 828-836 頁, 1998 年)。加えて、ラットにおけるホモログの単離に成功した。そしてこれらの知見を特許出願した (WO 99/15652)。

ところで、たとえば生殖発生毒性試験のような動物実験の結果をヒトに外挿するには、生理状態がヒトに良く似た動物を利用した実験系が必要である。生殖発生毒性試験は、医薬品の生体への適用がその生殖発生の過程において、何らかの悪影響を誘発するかどうかに関する情報を得ることを目的として行われる動物試験である。得られた試験結果は、ヒトへ外挿され、ヒトの生殖発生に対する医薬品の安全性（危険性）の評価に利用される。

ラットは、実験動物としての歴史が長く、生殖生理に関する知見や一般的な代謝様式がかなりよく知られている。加えて、成熟に至るまでの期間と妊娠期間や授乳期間が比較的短く、自然発生奇形も比較的少ない。このような利点によって、ラットは生殖発生毒性試験の試験動物として好適である。また、生殖発生に関する試験に用いられた経験が最も豊富な動物種であり、背景データも多い。生殖発生毒性試験においては、障害を観察すべき臓器に応じた様々なマーカーが測定される。腎機能のマーカーとしては、血中クレアチニン、尿中のアルブミンやグロブリンなどが公知である。しかしこれらのマーカーは、腎機能を総合的に評価するためのものである。したがって、メサンギウム増殖性腎炎の病態を反映するものではない。メサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。またメサンギウム細胞の増殖や細胞外メサンギウム基質の蓄積は、末期腎不全の 2 大原因である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症のよう

な種々の糸球体障害を有する患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている (D.Schlondorff, *Kidney Int.*, 第 49 卷, 1583-1585 頁, 1996 年; R.B.Ste rzel et al., *Glomerular mesangial cells. Immunologic Renal Diseases*, 595-626 頁, 1997 年)。したがって、ラットにおいて、メサンギウム増殖性腎炎の病態を反映する指標の提供が望まれる。

### 発明の開示

本発明は、上記のような課題を解決し、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断や重症度の判定を可能とする方法と、そのための試薬の提供を課題としている。

まず本発明者は、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断および重症度を判定するためには、病態と密接に関連した特異的なタンパク質を測定する必要があると考えた。そこで、糸球体に存在するメサンギウム細胞 (mesangial cell) に注目した。メサンギウム (mesangium) は、腎糸球体の毛細管係蹄の小葉中心部に位置し、各小葉を結びつける芯となる組織である。メサンギウムは糸球体基底膜に覆われており、毛細管腔とは内皮細胞によって隔てられている細胞 (メサンギウム細胞) と 3 層からなる糸球体基底膜の中の内透明層と連続している無形物質 (メサンギウム基質 : mesangial matrix) から構成されている。

ヒトのメサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしていることが知られている。またその増殖は、糸球体腎炎や糸球体硬化症などの糸球体疾患の発症における主要な要因であると考えられている。そして、メサンギウム細胞は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖や細胞外メサンギウム基質の蓄積は、末期腎不全の 2 大原因である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症のような種々の糸球体障害を有する患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている (D.Schlondorff, *Kidney*

Int., 第 49 卷, 1583-1585 頁, 1996 年 ; R.B.Sterzel et al., Glomerular mesangial cells. Immunologic Renal Diseases, 595-626 頁, 1997 年)。

更に本発明者らは、ヒト体液中のメグシンタンパク質と、腎疾患の病態の進行との相関関係を明らかにし、この知見を特許出願した(WO00/57189)。この知見により、ヒトにおいては、体液中のメグシン測定値が腎機能の指標として有用であることが明らかにされた。

ラットにおいても、メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を見いだし、その発現の調節機構や腎疾患における病態との関連性を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、更にはメサンギウム細胞に関連する疾病的治療、診断等に有効であると考えられる。

本発明者は、ラットにおいても腎疾患の発症およびその亢進に関連してメグシンタンパク質遺伝子の発現が増加し、それに伴ってメグシンタンパク質の産生が増大すれば、尿中あるいは血中へメグシンタンパク質が漏出し、しかもその漏出量は病態の進行に伴って増加するのではないかと考えた。そしてこのメカニズムを確かめるために、様々なラット生体試料中のメグシンタンパク質濃度、あるいはその量の測定と比較を試み、その測定値に基づいてメグシンタンパク質が関与した腎疾患の状態を評価し得ることを見出し本発明に到達した。すなわち本発明は、以下のメサンギウム増殖性腎炎の診断方法、そのための試薬、ラット・メグシンに対する抗体、並びにその用途に関する（以下、本明細書においては、メグシンタンパク質を単にメグシンと記載する場合もある）。

- 〔1〕配列番号：3 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体。
- 〔2〕モノクローナル抗体である〔1〕に記載の抗体。
- 〔3〕配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドと、アジュバントを含む組成物。

〔4〕ラット由来の生体試料中のメグシンタンパク質を、〔1〕に記載の抗体と反応させ、抗原抗体反応の生成物を検出する工程を含むラット・メグシンの測定方法。

〔5〕〔1〕に記載の抗体を含む組成物。

〔6〕抗体が標識されているか、または担体に固定化されている〔5〕に記載の組成物。

〔7〕以下の工程を含む、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎を診断する方法。

a) 被検ラット由来の生体試料中のラット・メグシンタンパク質を、〔1〕に記載の抗体と反応させ、抗原抗体反応の生成物を検出する工程、および

b) 正常ラットのラット・メグシンの測定値と比較してラット・メグシン測定値が高い場合にメサンギウム増殖性腎炎と診断する工程、

〔8〕被検ラットのメグシン測定値を経時的に観察することによって、メサンギウム増殖性腎炎の病態の悪化または改善をモニタリングする〔7〕に記載の方法。

〔9〕〔1〕に記載の抗体の、ラットのメサンギウム増殖性腎炎の診断剤の製造における使用。

〔10〕〔1〕に記載の抗体の、ラットのメサンギウム増殖性腎炎の診断における使用。

あるいは本発明は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含むペプチドの、ラット・メグシンを認識する抗体の製造における使用に関する。

ラット・メグシンタンパク質は、ヒト腎メサンギウム細胞で高度に発現している遺伝子のラットにおけるホモログ（配列番号：1）によってコードされるタンパク質（配列番号：2）として単離された。ヒト・メグシンは腎機能の指標となることは明らかにされているが、ラットにおいてメサンギウム増殖性腎炎の指標として有用であることは、知られていない。本発明におけるメグシンタンパク質

には、配列番号：2に示すアミノ酸配列を持つタンパク質（ラット・メグシンタンパク質）のみならず、その機能的に同等なタンパク質も含まれる。機能的に同等なタンパク質としては、以下のDNAによってコードされるタンパク質が含まれる。

- (a) 配列番号：1の塩基配列のコード領域を含むDNA
- (b) 配列番号：2のアミノ酸配列をコードするDNA
- (c) 配列番号：1の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、ラットのメサンギウム細胞で高度に発現しているDNA
- (d) 配列番号：2のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が、置換、欠失、不可、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードし、ラットのメサンギウム細胞で高度に発現しているDNA

このようなDNAは、たとえばラット培養メサンギウム細胞から抽出したmRNAを鋳型としてRT-PCRを行うことによって得ることができる。RT-PCRに必要なプライマーは、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいて設定することができる。

本発明において用いられるメグシンタンパク質の測定法は制限されない。たとえば、メグシンタンパク質に対する抗体と、メグシンタンパク質との免疫学的反応を応用した免疫学的測定方法は特異性と感度の点で優れている。このような例としては、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、エンザイムイムノアッセイ、化学発光分析、イムノヒストケミスト(Immunohistochemist)分析が含まれる。またメグシンタンパク質に対する抗体を利用して、ウェスタンプロット法によりメグシンタンパク質を測定することもできる。また、これらのイムノアッセイは、例えば免疫沈降とその後のウェスタンプロット法のように組み合わせて用いることもできる。これらの分析手段は、当該技術分野において公知である。

イムノヒストケミスト（免疫組織染色）とは、分離したラットの細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、血清、胸水、腹水、眼液などに本発明の

抗体を反応させ、さらにフルオレシンイソチオシアネート (FITC)などの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識を施した抗マウス IgG 抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。各標識物質は、ビオチン化した抗体にストレプトアビシン結合標識物質を結合させることによって間接的に標識することもできる。その他メグシンタンパク質がプロテアーゼインヒビターであることから、プロテアーゼの阻害活性を指標として検出することが可能である。あるいは、プロテアーゼに対する親和性を利用してメグシンタンパク質の測定を実施することができる。

メグシンタンパク質の免疫学的な測定方法に必要な抗体は、検出対象であるメグシンタンパク質を認識することができるものであれば、その由来や調製方法は限定されない。したがって、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、あるいはそれらの混合物等を利用することもできる。また、抗体分子の可変領域を含む断片を利用することもできる。メグシンタンパク質の抗体は、たとえば以下のようにして得ることができる。本発明に用いる抗体には、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグシンタンパク質またはその部分アミノ酸配列に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）、あるいは抗血清は、メグシンタンパク質、その部分アミノ酸配列を含むオリゴペプチド、あるいは c-myc-(His)<sub>6</sub>-Tag-メグシンタンパク質やMBP-メグシンタンパク質のような融合タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。なお部分アミノ酸配列を有する合成ペプチドを免疫原とする場合には、できるだけメグシンタンパク質に特異的に存在し、かつ親水性の高い部分のアミノ酸配列を利用するのが一般に有利である。

本発明は、ラット・メグシンの免疫学的な測定において特に有利な抗体を提供する。すなわち本発明は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列(ESNIVEKLLPESTV)

- 10 -

からなるペプチドを認識する抗体に関する。ラット・メグシンにおけるこの領域は、メグシンが属する SERPIN スーパーファミリーの中で、ラット・メグシンに特異的に見出されるアミノ酸配列を含んでいる。したがって、この領域を認識する抗体は、ラット・メグシンに対して特異性に優れると言うことができる。SERPIN スーパーファミリーには、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター 1 あるいは 2 のような、生体液中に一般に見られるタンパク質も多い。したがって、これらのタンパク質との交差性が低いことは、診断指標としてのメグシンを免疫学的に測定する上で有用な特徴である。また、メグシンタンパク質の活性部位は現在のところ必ずしも明らかではないが、仮に本発明のペプチド抗体がメグシンタンパク質の活性部位以外の領域と結合している場合、メグシンタンパク質とペプチド - 2 抗体が結合したままで生理活性測定などの試験に供することができる。従って、単離・精製したメグシンタンパク質ペプチド - 2 抗体結合物を直ちに試験に用いることができるから、試験の迅速化が期待できる。

更に本発明は、前記抗体の調製に用いることができる免疫原組成物に関する。本発明の組成物は、配列番号 : 3 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを、アジュバントとともに含む。本発明において、前記ペプチドは、少なくとも配列番号 : 3 に記載のアミノ酸配列を含む。前記ペプチドは、配列番号 : 3 の配列に加え、配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列のうち、配列番号 : 3 に記載のアミノ酸配列に隣接するアミノ酸残基を含むことができる。あるいは前記ペプチドは、配列番号 : 2 から選択されたアミノ酸配列に、更に不活性なアミノ酸配列を付加することもできる。本発明において、配列番号 : 3 に記載のアミノ酸配列に対して、更に付加的なアミノ酸配列を含むペプチドを構成するアミノ酸の数は、通常 10 以下、好ましくは 5 以下、より好ましくは 3 以下、特に好ましくは 2 以下である。一方、前記アジュバントには、免疫動物に対して免疫増強作用を有するあらゆる物質を用いることができる。具体的には、後に述べる担体タンパク質や、細菌毒素、あるいは細菌の菌体成分等がアジュバントとして用いられる。ア

ジュバントとして担体タンパク質を用いるときには、前記ペプチドに結合させておくこともできる。

本発明によるラット・メグシンタンパク質の部分アミノ酸配列を有するペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または担体、希釈剤と共に投与される。本発明の免疫原を構成するペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含むものであれば、いずれのペプチドを用いることもできる。したがって、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含む部分ペプチド、あるいはこのアミノ酸配列に不活性なアミノ酸配列を付加したペプチドなどは、本発明に含まれる。本発明の免疫原は、ラット・メグシンタンパク質の切断によって得ることができる。あるいは、必要なアミノ酸配列を持つペプチドを、化学的に合成することもできる。ペプチドは、ウシチログロブリンやキーホールリンペットヘモシアニン（以下 KLH と省略する）のような担体タンパク質と結合させて免疫原として使用する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとともに投与することができる。投与は通常 1～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2～5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後述の標識化メグシンタンパク質と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。

本発明によるモノクローナル抗体は、メグシンタンパク質に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、

- 12 -

連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10 ~ 20 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、たとえば配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも 7 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、ラット・メグシンタンパク質特異的なモノクローナル抗体といえる。

抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えば DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルfiltration 法、抗原結合固相またはプロテイン A またはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られたラット・メグシンタンパク質を認識するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体は、本発明によるメサンギウム増殖性腎炎の診断に利用することができる。すなわち本発明は、配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を含む組成物に関する。本発明の抗体含有組成物において、抗体は、好ましくは、標識され、あるいは担体に固定化される。本発明の組成物は、ラット・メグシンの免疫学的な測定に有用である。これらの抗体を用いてラット・メグシンタンパク質を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と、標識分子を結合した標識化抗体とによりメグシンタンパク質を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ラット・メグシンタンパク質と検体中のラット・メグシンタンパク質を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のラット・メグシンタンパク質を測定する競合法を利用して検体中のラット・メグシンタンパク質を測定することができる。

- 1 3 -

サンドイッチ法によるラット・メグシンタンパク質の測定においては、まず、固定化抗体とラット・メグシンタンパク質とを反応させた後、未反応物を洗浄によって十分に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-ラット・メグシンタンパク質標識化抗体を形成させる2ステップ法、若しくは固定化抗体、標識化抗体及びラット・メグシンタンパク質を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えば粒子状、トレイ状、球状、纖維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

一方、ヒト精子の受精能を評価するための試薬として、固体顆粒の表面に、先体反応後のヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体を結合してなる、精子受精能検出用顆粒が知られている（特許第2651249号）。この検出用顆粒は、先体反応後のヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体を固体顆粒に結合させているものである。これに精子を結合させて、結合した精子を計数することにより、ヒト精子の受精能を評価することができる。放射能、蛍光などの煩雑な測定手段を必要とせず、短時間で容易・確実に受精能の試験が可能である。また、磁性を有する固体顆粒を用いる場合は、磁石により容易に固体顆粒を集束させることができ、微量サンプルの測定も可能となる。この技術をメグシンタンパク質の検出に適用することにより、より簡便かつ正確なメグシンタンパク質の検出が可能になる。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミ

- 1 4 -

ジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート及び N-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる 2 種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第 3 の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{3}\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、あるいは $^{35}\text{S}$ 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサール又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサール又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。

抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によつて容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によつては、そのフラグメント、例えば  $\text{Fab}'$ 、 $\text{Fab}$ 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$  を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサール(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識化抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液

として  $H_2O_2$  を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS) 、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジン等を使用することができる。酵素にアルカリフェオスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフェオスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素に  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) 、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグシンタンパク質の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明におけるラット・メグシンタンパク質の測定対象は、ラット・メグシンタンパク質、あるいはその前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。具体的な測定対象としては、たとえば血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等を挙げることができる。これらの生体試料の中でも特に尿においては、メサンギウム細胞の増殖や活性化に伴って高い頻度でメグシンタンパク質が検出されるようになる。したがって、尿中メグシンタンパク質の測定は、IgA 腎症などのメサンギウム増殖性腎炎のマーカーとして有用である。

本発明におけるメサンギウム増殖性腎炎の診断とは、腎臓組織を構成する重要な細胞であるメサンギウム細胞の状態を把握し、メサンギウム細胞に異常を生じる腎疾患の有無、あるいはその程度を知ることを意味する。本発明におけるメサンギウム増殖性腎炎とは、メサンギウム細胞の増殖を伴う腎炎の全てを含む。具体的には、IgA 腎症、急性糸球体腎炎、巢状糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎炎、およびループス腎炎などが挙げられ、かかる腎疾患により変化した腎機能の状態が本発明の方法によって評価することができる。本発明による腎機能の評価方法は、これらの疾患の中でも IgA 腎症のようなメサンギウ

ム増殖性腎炎のマーカーとして特に有用である。また、本発明の腎機能評価方法は、腎疾患の有無や程度の判定の他、治療効果の評価や予後の判定に適用することができる。更に、本発明による腎機能の評価方法によれば、尿タンパクの検査で陽性を示す検体についてメグシンタンパク質の量を測定することにより、メサンギウム細胞の増殖に起因しない急性腎孟腎炎、慢性腎孟腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群、慢性糸球体腎炎、および腎アミロイドーシスなどの疾患を除外することができる。

本発明におけるメサンギウム増殖性腎炎には、上記疾患に加え、人為的に誘導される腎炎が含まれる。人為的に誘導される腎炎としては、様々な毒性物質によってラットの腎に引き起こされるメサンギウム増殖性腎炎症状を挙げることができる。このような人為的に誘導された腎炎ラットは、各種の毒性試験等に用いることができるが、メグシンを評価の指標とすることで、より的確な判定が可能となる。たとえば、ラットを用いた生殖発生毒性試験において、メグシンを指標とすることにより、メサンギウム増殖性腎炎を的確に、そして容易に診断することができる。ラットにおける毒性試験の結果は、容易にヒトへ外挿することができる。ラットの生理的な状態はヒトに類似している上、指標として測定するメグシンがヒトとラットにおいて共通のマーカーであることから、ラットの実験結果のヒトへの外挿は容易である。本発明は、ラットにおけるメグシンが、単に構造的なホモログであるのみならず、メサンギウム増殖性腎炎の指標として有用であるを見出した点に大きな意義がある。

たとえば後に述べる実施例で明らかにされているように、抗 Thy1 抗体の投与によって人為的に腎炎症状を誘導したラットにおいて、尿中ラット・メグシンの顕著な上昇が見られた。このことは、ラット生体液中のメグシンが、メサンギウム増殖性腎炎の鋭敏なマーカーとして有用であることを裏付けている。したがって、人為的にメサンギウム増殖性腎炎を誘導したラットに、治療薬候補化合物を投与し、その生体液中のメグシン濃度を追跡することにより、候補化合物の治療

効果を評価することができる。なお本発明において、抗 Thy1 抗体の投与によつて誘導される腎炎を ATS と記載する場合がある。

あるいは、アンチセンス DNA やトランスジェニックラットのように、遺伝子操作によってメサンギウム細胞に異常をもたらされたラットにおける、メサンギウム増殖性腎炎の病態の変化を本発明によって追跡することができる。

本発明に基づいて、メサンギウム増殖性腎炎の診断を行うには、診断すべき個体の生体試料を採取し、これに含まれるメグシンタンパク質の濃度を先に述べたような方法に基づいて測定する。そして望ましくは、濃度と体液の体積とからメグシンタンパク質の量を明らかにし、正常ラットの値と比較する。メグシンタンパク質の量を求めるには、尿を試料として用いる場合には、たとえば 1 日分の尿をプールして尿量を測定すれば、尿における 1 日あたりのメグシンタンパク質の量を明らかにすることができます。あるいは、随時尿を試料とした場合であっても、クレアチニン補正によって量に類する値を推定することもできる。クレアチニン補正とは、クレアチニンの濃度に基づいて尿量の変動による測定対象成分の希釈（または濃縮）の影響を補正する手法である。1 日当たりの尿へのクレアチニン排泄量が一定であることにに基づいて、クレアチニンの濃度から随時尿が 1 日における尿の総排泄量に占める割合を算出し、同じ尿から得られた測定対象成分の濃度を 1 日当たりの総排泄量に換算することができる。また血液においては、体重補正などの腎機能診断の際に一般的に使用される数値補正を適用して量の推定が可能である。体重補正とは、血液を採取した個体の体重から推測される血液の体積に基づいて、血液中成分の量を算出する手法である。

この他に、ある個体に由来する生体試料のメグシンタンパク質濃度の変動を観察すれば、量への換算を行わなくても腎機能の変化を経時的に追跡することができる。あるいは、特定の種、などの集団における体液試料のメグシンタンパク質濃度の正常値を予め設定しておき、特定の個体のメグシンタンパク質濃度（また

は量)と比較することにより、メサンギウム増殖性腎炎の有無を知ることもできる。

本発明において、生体試料としては、尿や血液を用いることができる。中でも尿は、非侵襲的に採取することができ、腎機能の状態を直接的に反映する好ましい試料である。血液の採取は若干の侵襲を伴うものの、メグシンタンパク質が腎臓に特異的なタンパク質であることから、その測定値の異常は、腎機能の異常と密接に関連している。したがって、腎機能の指標として高い特異性を期待することができる。以下に、モノクローナル抗体を利用したメグシンタンパク質の免疫学的な測定方法に基づいて尿中のメグシンタンパク質を測定し腎機能を評価するための具体的な操作について詳細に説明する。

#### (A) 抗体の製造

##### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

動物の免疫は、例えば次のように行う。ラット・メグシンタンパク質の部分ペプチド(たとえば配列番号: 3のアミノ酸配列からなるペプチド)を合成し、KLHと結合して免疫原とする。この免疫原をマウスなどの哺乳類動物に免疫する。哺乳類動物は細胞融合する際の相手の永久増殖性細胞と同系統の動物を用いるのが好ましい。動物の週令は、例えばマウスでは8~10週令が好適である。性は雌雄何れでも構わない。免疫の方法は、前記免疫原を適当なアジュバント(例えばフロイント完全アジュバントまたは水酸化アルミニウムゲルー百日咳菌ワクチンなど)と混合しエマルジョンとした後、動物の皮下、腹腔内、静脈内などに投与する。以後、この免疫操作を1~2週間間隔で2~5回行う。最終免疫は、0.5~2  $\mu$ gの免疫原を動物の腹腔内に投与することにより行う。このようにして免疫した動物の体液からは、ポリクローナル抗体が得られる。各免疫操作後3~7日後に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を以下に示すプロテインAロゼットアッセイ法(Eur.J.Immunol., 第4巻, 500-507頁, 1974年)により測定し、抗体価が充分上昇したとき、抗体または抗体産生細胞を採取する。

- 2 0 -

プロテインAロゼットアッセイ法は、例えば、72穴のテラサキプレート（ファルコン製）にヒト赤芽球性細胞株K562（ジャパニーズ・キャンサー・リサーチ・リソーシズ・バンク（J C R S）製）をコートし、P B S（リン酸二ナトリウム2.90g、リン酸一カリウム0.20g、塩化ナトリウム8g、塩化カリウム0.2g、蒸留水1L）で希釈した試料を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に37°Cで30分間放置する。そして、P B Sで洗浄後、プロテインA（アマシャム・ファルマシア・バイオテク製）をコートしたヒツジ赤血球を加えてロゼットの形成を顕微鏡で観察することによって実施される。

上記のように合成ペプチドで免疫した動物から抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞は、脾臓、リンパ節、末梢血などから得ることができるが、特に脾臓が好ましい。例えば、最終免疫の3～4日後に脾臓を無菌的に摘出し、Minimal Essential Medium（M E M）培地（日本製薬製）中で細断し、ピンセットで解し、1200 rpm×5分間の条件で遠心分離させた後、上清を除き、トリス-塩酸緩衝液（pH 7.65）で1～2分間処理して赤血球を除去し、さらにM E M培地で3回洗浄して細胞融合用脾臓細胞を得る。

## （2）永久増殖性細胞の調製

融合される相手方の永久増殖性細胞には、永久増殖性を有する任意の細胞を用いることができるが、一般的には骨髄腫細胞が用いられる。永久増殖性細胞は抗体産生細胞と同種の動物由来のものを用いるのがよい。例えばマウスの場合、8-アザグアニン耐性マウス（B A L B/c）由来骨腫瘍細胞株として次のような細胞株が知られている。

P 3-X 6 3 A g 8-U 1 (P 3-U 1) (Current. Topics in Microbiol. Immunol., 第81巻, 1-7頁, 1978年)、

P 3/N S 1/1-A g 4-1 (N S-1) (Eur. J. Immunol., 第6巻, 511-519頁, 1976年)、

S P 2/0-A g 1 4 (S P-2) (Nature, 第276巻, 269-270頁, 1978年)、

- 2 1 -

P 3-X 6 3-A g 8 6 5 3 (653) (J. Immunol., 第 123 卷, 1548-1550 頁, 1979 年)、および

P 3-X 6 3-A g 8 (X 6 3) (Nature, 第 256 卷, 495-497 頁, 1975 年)

これらの永久増殖性細胞株は、8-アザグアニン培地 (RPMI-1640 培地にグルタミン ( $1.5 \text{ mM}$ )、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ )、ゲンタマイシン ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) およびウシ胎児血清 (FCS、CLS 製) (10%) を加えた正常培地に、さらに 8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g/mL}$ ) を加えた培地) で継代培養し、細胞融合の 3~4 日前に正常培地に継代し、融合当日  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

### (3) 細胞融合

細胞融合は例えば次のように行う。(1)で得られた抗体産生細胞と(2)で用意した永久増殖性細胞を MEM 培地または PBS でよく洗浄し、細胞数が 5~10:1 の比になるように混合する。1200 rpm × 5 分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿した細胞群をよく解した後、攪拌しながら 37°C に保ちつつ、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1~4 g、MEM 培地 1~4 mL およびジメチルスルホキシド 0.5~1.0 mL の混液 0.1~1.0 mL/10<sup>8</sup> 個細胞を加えて細胞融合を起こさせる。その後、10 分毎に MEM 培地 3 mL を数回添加し、MEM 培地を全量が 50 mL になるように加えて希釈し、細胞融合を停止させる。次に、遠心分離 (1500 rpm × 5 分間) して上清を除去し、緩やかに細胞を解した後、正常培地 (RPMI-1640 培地、10% FCS) 100 mL を加え、メスピペットによるピベッティングで緩やかに細胞を懸濁する。この懸濁液を 96 ウエルの培養用プレートに 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°C で 3~5 日間培養する。培養プレートに 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  の HAT 培地 (正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4} \text{ M}$ )、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) およびアミノブテリン ( $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) を添加した培地) を加え、さらに 3 日間培養する。以後 3 日間毎に培養上清の半容量を除去し、新た

- 2 2 -

に同量のHAT培地を加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで約2週間培養する。

#### (4) ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

融合細胞がコロニー状に生育しているのが認められるウエルについて、上清の半容量を除去し、HT培地（HAT培地からアミノプロテリンを除いたもの）を同量加え、4日間培養する。培養上清の一部を採取し、前述のプロテインAロゼットアッセイ法によりラット・メグシンタンパク質に対する抗体価を測定する。抗体価は、例えばラット・メグシンタンパク質抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗ラット・メグシンタンパク質モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したラット・メグシンタンパク質を加え、固相に結合した抗ラット・メグシンタンパク質モノクローナル抗体を検出する方法等によって確認することもできる。

ラット・メグシンタンパク質に反応する抗体の産生が観察されたウエルにつき、限界希釈法によりクローニングを4回繰り返し、安定したメグシンタンパク質の抗体価を示すものを抗ラット・メグシンタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### (5) モノクローナル抗体の調製

上記のようにして得られたハイブリドーマを *in vitro* および *in vivo* で培養することによりモノクローナル抗体を産生させる。*in vivo* で培養する場合、任意の動物にハイブリドーマを移植するが、細胞融合に用いた脾臓細胞を採取した動物と同種の動物を使用するのが好ましい。例えば、プリスタン処理（2,6,10,14-テトラメチルペントデカン-1-プリスタン-0.5mLを腹腔内投与し、

- 2 3 -

2週間飼育する。) をした8～10週令のB A L B/c 雌マウスに(4)で得られた抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の2～4×10<sup>6</sup>個/匹腹腔内投与する。2～3週間でマウスの腹腔内にモノクローナル抗体を高濃度に含んだ腹水が貯留し腹部が肥大してくる。このマウスから腹水を採取し、遠心分離(3000 rpm×5分間)して固形分を除去し、IgGを精製する。一方ハイブリドーマの *in vitro*での培養は、好ましくは無血清培地中で行われ、至適量の抗体をその上清に与える。腹水や培養上清を50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、P B Sで1～2週間透析する。この透析画分をプロテインAセファロースカラムに通し、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得る。

抗体のイソタイプは、オクタロニイ(二重免疫拡散)法(免疫学実験入門、生物化学実験法15、学会出版センター刊、74頁、1981年)により決定した。タンパク質量は、フォーリン法および280 nmにおける吸光度(1.4(OD<sub>280</sub>)=イムノグロブリン1mg/mL)により算出する。

#### (6) モノクローナル抗体の特性

上記のようにして得られたモノクローナル抗体の特性は、例えば、(1)細胞表面をヨウ素ラベルしたH S B-2、K 5 6 2などのヒトリンパ球由来の細胞株を用いる免疫沈降反応(J. Immunol., 第138巻、2850-3855頁、1987年)および(2)酵素免疫測定法(ELISA法)(J. Immunol., 第142巻、2743-2750頁、1989年)等により明らかにことができる。

#### (7) 標識結合モノクローナル抗体の調製

得られた精製モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒド法(Immunochem., 第6巻、43頁、1969年)、過ヨウ素酸法(J. Histochem. Cytochem., 第22巻、1084頁、1974年)、マレイミド法(J. Biochem., 第79巻、233頁、1976年)、ピリジル・ジスルフィド法(Biochem. J., 第173巻、723頁、1978年)などの方法により、酵素標識することができる。

例えば、過ヨウ素酸法を用いた場合、ペルオキシダーゼ溶液（4 mg/mL）に 50  $\mu$ L の過ヨウ素酸（38.5 mg/mL）を攪拌しながら加え、室温で 20 分間反応させた後、1 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）に置換した PD-10（アマシャム・ファルマシア・バイオテク製）を用いて緩衝液交換を行う。次に 0.2 M の水酸化ナトリウム 40  $\mu$ L を加える。これに 10 mM 炭酸緩衝液（pH 9.5）で透析したモノクローナル抗体 10 mg を加え、室温で 2 時間反応する。反応終了後、氷冷し、100  $\mu$ L の水素化ホウ素ナトリウム溶液（4 mg/mL）を加え 2 時間反応させる。反応液を PD-10 を用いて PBS に交換した後、3000 rpm  $\times$  30 分間遠心分離し、上清をセファクリル S 200 HR 26  $\times$  30（アマシャム・ファルマシア・バイオテク製）を用いてゲルfiltrationして、403 および 280 nm の吸光度を測定し標識モノクローナル抗体の画分を分取する。得られた分画にウシ血清アルブミン（10 mg/mL）を加え、-20°C で保存し、使用直前に PBS-Tween（登録商標）20 で希釈する。

#### （B）検出用顆粒の製造

この発明で使用する検出用顆粒は、適当な顆粒、例えばクロマト用ゲルに、物理的または化学的に抗メグシンタンパク質抗体を結合させることによって製造することができる。化学的に活性化した顆粒に、本発明で用いる抗体を結合させる方法は、結合安定性を期待できることから望ましい結合方法である。具体的には、p-トルエンスルフォニルクロライドによってトシリ化活性された顆粒に、本発明で用いる抗体を結合させる方法を示すことができる。

顆粒としては、ガラス、アガロース、セファロース、アガロース充填多孔性珪藻土、親水性共重合アクリルゲル、ポリスチレン等からなる顆粒が用いられる。磁性を有する顆粒を使用すれば、磁石等を用いて顆粒を集束することができるので、微量サンプルの測定が可能となる。たとえば可磁性物質（例えば  $Fe_2O_3$ ）をコア内に含めることにより超常磁性を持たせた顆粒とすることができる。このような顆粒は、免疫学的分析用の固相として市販されている。顆粒の形状は

- 2 5 -

球形、不定破碎形等任意であるが、球形が好ましい。粒径は特に制限されず、例えば平均粒径 5～1000  $\mu\text{m}$  を示すことができる。また、反応液の比重（約 1）よりも比重の大きな顆粒を用いた場合も顆粒の集束が容易となり、磁性を有する顆粒を用いたときと同様の効果が得られる。さらにこの場合、顆粒を集束するための遠心分離の条件を緩やかにできるため、結合が外れ易い抗体を使用する際にも有利である。

顆粒への抗ラット・メグシンタンパク質抗体の結合は、直接的な結合のみならず間接的な結合を利用することもできる。たとえば、マウスのモノクローナル抗体を用いる場合であればマウスの IgG を認識する抗体を顆粒に結合し、間接的に顆粒上にマウスの抗体を結合することができる。このような抗体は二次抗体と呼ばれている。間接的な結合には、二次抗体の他、イムノグロブリンの定常領域を結合するプロテイン A やプロテイン G の利用、あるいはビオチン化した抗体をアビデンを固定した顆粒で捕捉する方法等を応用することもできる。上記のような顆粒に二次抗体、プロテイン A またはプロテイン G を化学的に結合させるには、顆粒を活性化させてから結合させるのが好ましい。顆粒の活性化は、この種の顆粒にタンパク質を結合させる際の任意の活性化法を選択することができる。このような活性化法には、トシリクロライド法、ブロムシアン法、ブロムアセチル法、グルタールアルデヒド法等がある。活性化顆粒の中には市販されているものもある。このような活性化、および活性化顆粒と二次抗体、プロテイン A またはプロテイン G 等のタンパク質との結合は、常法によって行うことができる。

また、既に二次抗体、プロテイン A またはプロテイン G 等を結合した顆粒も市販されている。市販の顆粒としては、たとえば次のようなものが知られている。日本ダイナル株式会社輸入、株式会社ベリタス販売のダイナビーズ（登録商標）

M-450、M-280

ヒツジ抗マウス IgG コートタイプ

ヤギ抗マウス IgG コートタイプ

- 2 6 -

ヒツジ抗ラット IgG コートタイプ

ヒツジ抗家兔 IgG コートタイプ

ポリサイエンス・インコーポレイティッド製

ヤギ抗マウス IgG (H & L) カルボキシレートビーズ

ヤギ抗家兔 IgG (H & L) カルボキシレートビーズ

プロテインAカルボキシレートビーズ

ヤギ抗家兔 IgG (H & L) ミクロマグネットパーティクル

ヤギ抗家兔 IgG (H & L) ミクロマグネットパーティクル

プロテインAミクロマグネットパーティクル

ヒツジ抗マウス IgG (H & L) ミクロマグネットパーティクル

上記のような顆粒に本発明で用いる抗体を結合させるには、適当な媒質中で懸濁した顆粒をタンパク質溶液で処理して非特異的吸着を防止した後、抗体を含む腹水または精製した抗体の溶液を混合する。

#### (C) 検出法

本発明の検出法を実施するには、被験ラットから血液または尿を採取し、遠心分離後の上清を検体とする。尿の遠心分離は沈殿を分離するために行うもので、静置後の上清やろ過によって沈殿を除いた尿試料を利用することもできる。前記のようにして製造した検出用顆粒に希釈した検体および(7)で得られた標識結合抗体を加え、室温で2時間インキュベーションする。反応終了後、洗浄し、基質液を加えて発色後、遠心分離して顆粒を除去し、上清をマイクロプレートに移し、吸光度を測定する。同様に正常者の検体も測定し、値を比較する。値の比較にあたっては、単にラット・メグシンタンパク質の濃度としての比較の他に、その個体の体液の体積を乗じて得ることができるラット・メグシンタンパク質の体液中の絶対量、あるいはそれに類する補正值に基づく比較を行うこともできる。

#### (D) キット

上記の試験を実施するために必要な材料は、キットとして供給することができる。このようなキットは、前述した抗体を固定化した検出用顆粒および磁石を含むことができる。さらに標識分子を結合した抗体を含むこともできる。そのほか、本発明によるキットには、試験管、遠心管、その他類似の容器、ピペットまたは類似の吸引器具、あるいは顕微鏡を含ませることができる。あるいはまた、標識を検出すために必要な酵素基質、陽性や陰性の標準試料などを組み合わせることもできる。なお上記検出用顆粒の代わりに、その製造原料となる固体顆粒と抗体の組合せとすることもできる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗ラット・メグシンペプチド-2抗体の力価を示すグラフ。横軸は希釈倍率、縦軸は吸光度(OD490nm)を表す。1～3はそれぞれウサギの個体を表す。

図2は、ラット・メグシンペプチド-2の部分アミノ酸配列(配列番号：1)を免疫原として得られたポリクローナル抗体の反応性をウェスタンプロット法によって調べた結果を示すゲル写真。各レーンは、以下のタンパク質に対応する。

- 1：MBP ヒトメグシンタンパク質融合タンパク質
- 2：CHO 細胞で発現させたメグシンタンパク質
- 3：ラットメサンギウム細胞ライセート
- 4：マーカー

図3は、正常なラットの腎臓組織に対して組織免疫染色した顕微鏡写真を示す。

図4は、異なる種におけるメグシンアミノ酸配列の比較を示す図である。Aはヒトとラット、Bはヒトとマウス、Cはラットとマウスの比較を示す。マッチした領域は斜線で表した。配列は、ウインドウサイズ8、最小%スコア60、ハッシュ値2でタンパク質スコアリングマトリックスパム250を用いて整列化した。

図5は、糸球体におけるメグシン発現細胞の同定と、ラット抗Thy1腎炎モデルを使用してメグシンの発現変動を半定量PCRにより確認した写真である。

- 2 8 -

A: 培養ラットメサンギウム細胞 (MC) におけるメグシンの発現を表す。培養ラット糸球体上皮細胞 (GEC) および糸球体内皮細胞 (GEN) では発現は検出限度以下であった。

B: 総 RNA  $1\mu\text{g}$  を cDNA 合成に用いて、半定量 PCR に利用した。PCR を 33 サイクル行ったところ、メグシンの発現亢進がはっきりと現れた。各レーンは異なる動物に相当し、3 動物を各時点で試験した。D は抗 Thy1 抗体処理後の日数を表す。

図 6 は、ノーザンプロット分析による、ラット抗 Thy1 腎炎モデルを利用したメグシン mRNA の発現変動を示す写真である。総 RNA  $10\mu\text{g}$  を電気泳動により分離しニトロセルロースフィルターにトランスファーした。メグシン mRNA は 8 日目にはっきりと検出された。左側のラベルはそれぞれ 28S および 18S リボソーム RNA のサイズに相当する (それぞれ 5.1 および 1.9kb)。

図 7 は、抗ラットメグシン抗体の特異性を表す写真である。組換えメグシンあるいはタンパク質 (各  $2\mu\text{g}$ ) を 10% SDS-PAGE により解析し、抗ラットメグシン抗体を用いてイムノプロットを行った (レーン 1 - 3)。

レーン 1、4、7 : CHO 細胞由来 c-myc-ヒスチジン標識メグシン

レーン 2、5、8 : *E.Coli* 由来 MBP-メグシン融合タンパク質

レーン 3、6、9 : MBP

レーン 4 - 6 : 過剰量の合成ラットメグシンペプチド  $\text{P}_2$  でブレインキュベートした抗ラットメグシン抗体

レーン 7 - 9 : 免疫形成前ウサギ IgG

各組換えタンパク質の位置を矢印で表した。

図 8 は、抗 Thy1 腎炎モデルラット由来腎臓の免疫組織化学的分析の結果を表す写真である。

(A) は競合実験の結果を表す。

(B) は、8 日目にメグシンタンパクが蓄積していることを示している。腎炎誘導後 2 日目まではメグシンタンパクの発現に著しい変化を認めなかった。メグシ

- 2 9 -

ンタンパクの蓄積は4日目にわずかに亢進した。メサンギウム領域は、8日目にメグシンタンパク染色に対し顕著な陽性反応を示した。メグシンタンパクの蓄積は14日目まで増加し、28日に基底レベルに戻った。倍率x200。

図9は、一連の切片を用いたメグシンおよび $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現を示す写真である。FITC標識した抗ラットメグシン抗体および抗 $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体を免疫蛍光染色した。メグシンは主に、 $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性領域に局在していたが、その領域以外にも観察された。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、この発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

##### 〔実施例1〕抗ラット・メグシン抗体の製造

###### (1) ラット・メグシンの合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

他のSERPINファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を利用し、ラット・メグシンに対するポリクローナル抗体を製造した。ラット・メグシンタンパク質のN末端から341～354番目のペプチドのC末端にシステインを含有するペプチド「H<sub>2</sub>N-E-S-N-I-V-E-K-L-L-P-E-S-T-V-C-COOH/配列番号：3」を固相ペプチド法により合成し（パーキンエルマー製、モデル432A）、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、MBS（m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシルスクシニミドエステル）を用いてキーホールリンペットヘモシアニン（KLH:Calbiochem-Novabiochem製）に結合させた。ウサギ1匹をフロイント完全アジュvant（DIFCO製）と混合したKLH結合ペプチド（200 $\mu$ g/匹）で皮内免疫した。初回免疫（30 $\mu$ g/羽）後3週間後に2回目（30 $\mu$ g/羽）の免疫を行い、以後2週間毎に5回免疫（各回、30 $\mu$ g/羽）を行った。2回目以降は、フロイント不完全アジュvant（DIFCO製）を用いた。32日後、46日後、60日後、79日後、95日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応するか確認するため、酵素免疫測定法（ELISA）により評価した。

- 3 0 -

すなわち、抗原 150ng/ウエルを固相化した 96 穴プレートに連続的に希釈した抗血清を各ウエルに 100  $\mu$ l 加えて一次反応を行い、洗浄後、二次反応として HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG (免疫化学研究所製) を反応させた。洗浄後、基質としてオルトフェニレンジアミン (和光純薬製) を用いて発色させ、吸光度 490nm で測定した (日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250)。各希釈倍率における吸光度を表 1 に示す。このときの測定値をグラフに表したものと図 1 に示す。

表 1

希釈倍率	1	2	3
100	1.411	1.069	1.376
200	1.162	0.969	1.337
400	1.018	0.848	1.211
800	0.769	0.611	0.976
1600	0.471	0.341	0.700
3200	0.248	0.161	0.389
6400	0.096	0.050	0.165
12800	0.036	0.017	0.067

32 日後、46 日後、60 日後、79 日後、および 95 日後に抗体価を測定した結果、抗体価が十分に上昇していることを確認した。得られた抗体はウエスタンプロットによりラット・メグシンタンパク質と反応することを確認した。

〔実施例 2〕抗ラット・メグシン抗体のヒトメグシンタンパク質に対する反応性  
ラット・メグシンの合成ペプチドに対するポリクローナル抗体は、公知の方法 (細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 抗ペプチド実験プロトコール、秀潤社) に従ってイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。操作は、次のとおりである。合成ペプチドを FMP (2-fluoro-1-methylpyridinium toluene-4-sulfonate) 活性化セルロファイン (生化学工業製) に固定化し、アフィニティーカラムを作製した。抗体は、実施例 1 のとおり、ラット・メグシンのド

- 3 1 -

メインペプチドを免疫し抗体価の上昇したウサギ血清を P B S ( - ) で希釈したのち、ペプチドカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた精製抗体はウエスタンプロットにより、次の試料と反応させることにより、抗原特異性を確認した(図2)。この抗体は、ヒト・メグシンとわずかながら反応し、ラット・メサンギウム細胞のライセートとは強い反応性が確認された。

レーン1：ヒト・メグシンタンパク質融合タンパク質(WO 99/15652)、

レーン2：CHO細胞で発現させたヒトメグシンタンパク質(CHO-メグシンタンパク質：T.Miyata et al., J.Clin.Invest., 第120巻, 828-836頁, 1998年、WO 99/15652)

レーン3：ラット・メサンギウム細胞ライセート

〔実施例3〕ラット・メグシン抗体を利用した腎臓組織に対する免疫組織染色(イムノヒストケミスト)

正常なラットから腎臓組織を採取した。腎臓組織は、常法に従い、凍結組織包埋剤(0. C. T. compound, Miles Laboratories)を用いて包埋した。この凍結包埋組織からフリオスタッフを用いて4μmの凍結切片を作製した。この凍結切片を3-アミノプロピルトリエトキシシラン(シグマ製)でコードしたスライド上にマウントした(4%パラホルムアルデヒド固定、15分)。

凍結切片を0.5%のTween20を含有するPBSで洗浄し、4%のスキムミルクでブロッキング後、4°Cの加湿チャンバー内で抗ラット・メグシン抗体と1晩インキュベートした。組織切片を洗浄し、1:100に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(DAKO製)を用いて室温で2時間インキュベートした。ペルオキシダーゼの検出には、0.003%の過酸化水素水を含有する3,3'-ジアミノベンジジン溶液を用いた。細胞核は、ヘマトキシリソで染色した。ヘマトキシリソ/エオシン染色は、公知の方法により実施した。

ラットの腎臓組織に対して組織免疫染色した顕微鏡写真(ニコン製ECLIPSE E 400:倍率80倍)を図3に示す。図から明らかなように、ラット腎臓糸球体組織

- 3 2 -

に本発明のペプチド抗体で染色される部位が存在し、特に、メサンギウム領域内の細胞内およびメサンギウム基質に顕著な陽性染色が認められたが、尿細管には認められなかった。

〔実施例4〕 抗 Thy1 腎炎モデルラットの作製法と動物検討の実験デザイン  
全ての動物実験は東京大学医学部動物実験指針 (Guide for animal  
Experimentation) により実施した。6 週齢の雄ウイスター ラット (日本チャーリズリバー製) を 1 週間の予備飼育の後、1.2mg/kg 体重の IgG1 マウスモノクローナル抗 Thy1 抗体 (OX-7) または基剤 (対照) を静脈内注射した。

〔実施例5〕 ラットメグシン cDNA のクローニング

(1) degenerate PCR による cDNA のクローニング

ISogen (Nippon Gene 製) および oligotex を用い、14 繼代目のラット培養メサンギウム細胞から mRNA を抽出した。この mRNA を逆転写酵素 SuperScript II (GIBCO 製) を逆転写反応に付し、得られた cDNA を鑄型とした。ヒトメグシンの cDNA を元に、degenerate プライマー FY : GTGAATGCTGTGTACTTAAAGGCAANTGN/配列番号 : 8 (172VNAVYFKGK180 に相当)、および R21 : AANAGRAANGGRTTCNGC/配列番号 : 9 (R は、A または G : 357ADHPFLF363 に相当) を作製し、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus 製) を用い、94°C45 秒 (変性)、50°C45 秒間 (アニーリング)、72°C2 分 (増幅)、35 サイクルの条件で PCR を行った。

予想される大きさ (576bp) に近い PCR 産物を pCRII ベクター (Clonetech 製) に組み込み、DNA オートシーケンサーを用いたダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

次にラットメグシンの 5' 領域を得るために、ラットメグシンのクローン断片から遺伝子特異的プライマーを調製し、再度 degenerate PCR を行った。

まず、ヒトメグシンをコードする配列の N-末端に対応する degenerate プライマー RM-CtermC1 : ATGGCNCNGCNGCNGCNGCNAAYGC/配列番号 : 10 (Y は T または C)、並びにラットメグシン特異的 reverse プライマーである RM-MR-A2 : CGACCTCCAGA

- 3 3 -

GGCAATTCCAGAGAGATCAGCCCTGG/配列番号：1 1 および RM-MR-A1 : GTCTTCCAAGCCTA CAGATTCAAGTGGCTCCTC/配列番号：1 2 を作製した。RM-CtermC1 および RM-MR-A2 を用いて、94°C45 秒、55°C45 秒、72°C 1 分、45 サイクルの条件で PCR を行った。次に得られた PCR 産物を鋳型として、RM-CtermC1 および RM-MR-A2 を用いて、9 4°C45 秒、55°C45 秒、72°C 1 分、25 サイクルの条件で nested PCR を行った。さらに增幅を促進するために、同一のプライマーを用い、94°C30 秒、55°C30 秒、7 2°C40 秒、25 サイクルの条件で PCR を繰り返した。

得られた PCR 産物を pGEM-T-easy ベクター(Promega 製)に組み込んだ。DNA 自動配列決定機を用いたダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

## (2) 5'-RACE 法および 3'-RACE 法による cDNA のクローニング

メグシンの開始コドンおよび終止コドンの部位に mutation の入っていないオープソリーディングフレームを完全に含む配列を決定し、全長の配列を確定するために、Marathon cDNA amplification kit (Clontech 製) を用い、上記で得られた配列を基にデザインされたプライマーを使って、5'-RACE および 3'-RACE 法を行った。5'-RACE には、2 種の遺伝子特異的アンチセンスプライマー RM-PR01 : GCTCAGGGCAGTGAAGATGCTCAGGGAAAGA/配列番号：1 3 および RM-PR02 : CTGACGTGCAC AGTCACCTCGAGCACC/配列番号：1 4 を用いた。一方、3'-RACE には、遺伝子特異的センスプライマー RM-MR-S3 : GAGGTCTCAGAAGAAGGCAGTGAGGCAACTGCTGCC/配列番号：1 5 を使用した。こうして得られた配列に基づいて、最終的に配列番号：1 に示す 1229bp からなるラットメグシンの cDNA 全長の塩基配列をほぼ決定した。

ラットメグシンのオープソリーディングフレームを含むクローニングを得るために、上記で得られた配列からデザインされた 2 種の遺伝子特異的プライマー RM-5' UTR -FS2 : CTCTATAGGAGACACTTGG/配列番号：1 6 (センスプライマー) および 3'-UT R-A1 : GAAACAAATCAAAGCAAAC/配列番号：1 7 (アンチセンスプライマー) を使用した。94°C45 秒 (変性) 、50°C で 45 秒 (アニーリング) 、72°C 1 分 30 秒 (増幅) 、35 サイクルの条件で PCR を実施した。予想される大きさ (約 1300bp) の

- 3 4 -

PCR 産物を pCRII ベクターに組み込んで、ラットメグシンのオープンリーディングフレームを含むクローンを単離した。

〔実施例 6〕 ラットおよびマウスマグシン相同分子の単離、同定

ラットおよびマウスマグシンは、380 個のアミノ酸を含み、アミノ酸レベルではヒトメグシンとの同一性がそれぞれ 75.3% および 73.9% であった（図 4A および B）。

〔実施例 7〕 メサンギウム損傷後の尿中蛋白質排泄量の変化

本発明者らは、ラットにおけるメサンギウム増殖性糸球体腎炎の代表的なモデルである抗 Thy1 腎炎を使用して、メサンギウム損傷後の尿中蛋白質排泄量の変化を評価した。

24 時間尿中のタンパク質濃度を市販のピロガロールレッドキット（和光純薬工業、東京、日本）を使用して測定し、24 時間尿試料中の総タンパク質量を算出した。遠心分離によって血清を血液試料から分離し、血中尿素窒素（BUN）を市販のウレアーゼ-インドフェノールキット（和光）を使用して測定した。

結果、8 日目では、抗 Thy1 処理ラットは、対照動物と比較して、尿中蛋白質排泄量が有意に増加していた ( $272 \pm 13.1$  対  $86.3 \pm 13.6$  mg/kg 体重、 $p < 0.05$ )。抗 Thy1 処理動物の腎臓の蛋白質尿の程度および組織学は 28 日目には正常に戻った ( $66.8 \pm 6.45$  mg/kg 体重)。

〔実施例 8〕 ラット糸球体由来培養細胞、および抗 Thy1 腎炎モデルラットにおけるメグシン mRNA の半定量 RT-PCR

ラット糸球体由来培養細胞、および抗 Thy1 腎炎モデルラットにおけるメグシン mRNA 発現量を検討するために、本発明者らは糸球体から RNA を抽出し、半定量 RT-PCR 分析を実施した。

詳しくは、3 匹のラットを処理前（0 日）、処理後の 2、4、8、14 および 28 日目に安樂死させ、従来の篩別法 (Salant DJ, et al., J.Clin.Invest., 66:71-81, 1980) により単離した糸球体から RNA を単離した。

- 3 5 -

培養糸球体細胞の総 RNA または各ラットの総糸球体 RNA の 1  $\mu$ g を使用して、製造業者のプロトコールに従って SuperScriptII (Gibco BRL) を用いて cDNA を合成した。逆転写反応混合物の 1  $\mu$ l をその後の半定量 RT-PCR に使用した。

ラット・メグシンのプライマーには、34~65bp に対応するラット・メグシン S27 フォワードプライマー (AGA ATT TGG CTT CGA CTT ATT CAG AGA GAT GG／配列番号：4)、481~513bp に対応するラット・メグシン AS506 リバースプライマー (ATG ACA GCT GAT GAG CTG AGG CTG CTG TCC CCC／配列番号：5) を使用した。PCR は、各サイクルが 94°C 1 分間の変性、60°C 1 分間のアニーリングおよび 72°C 1 分間の伸長のインキュベーションからなるもので実施した。 $\beta$ -アクチンについては、1455~1484bp に相当するラット  $\beta$ -アクチンフォワードプライマー (GTG TGA TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT／配列番号：6) および 2318~2288 に相当するラット  $\beta$ -アクチントリバースプライマー (ATG GCA TGA GGG AGC GCG TAA CCC TCA TAG／配列番号：7) を構築した。增幅産物は、アガロースゲル電気泳動によって可視化した。 $\beta$ -アクチン mRNA の增幅は、cDNA の完全性の対照に利用し、各メグシン增幅反応に対しほぼ等量の cDNA の分配を可能にした。 $\beta$ -アクチンおよびメグシン mRNA 増幅反応をさらに試験して、使用したサイクル数が反応プラトーにある、すなわち、確実に増幅の増加範囲内となるようにした。この試験は、25~40 サイクルの各増幅反応の進行を目で見てサンプリングして行った。従って、各増幅に使用した cDNA の量を正規化して  $\beta$ -アクチン mRNA に匹敵するシグナルを獲得し、また反応プラトーで検出するために反応パラメーターを選択したので、メグシン mRNA のアッセイは半定量であった。RT-PCR の陰性対照は逆転写酵素を欠損した、または cDNA 鑄型を欠損した平行増幅反応を含む。

結果、培養細胞中にメグシンの発現が確認されたが、糸球体上皮細胞または内皮細胞では確認されなかった (図 5A)。これは、ラットメグシンも主にメサンギウム細胞において発現することを示唆している。また、PCR を 33 サイクル行

- 3 6 -

った場合、8日目にメグシンの発現亢進がはっきりと観察された（図5B）。3つの独立したRT-PCRにおいても、本質的に同じ結果が得られた。

#### 〔実施例9〕ノーザンプロット分析

ラットの各組織におけるメグシン発現分布を検討するため、ノーザンプロット分析を行った。

ラットのノーザンプロット膜は、Multiple Tissue Northern Blots（商標：Clontech製）を使用した。Multiple Northern Tissue Blotsは、心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および精巣由来のpoly+RNAを2 $\mu$ g含有する。

結果、データは示していないが、メグシンはすべてにおいて検出できなかった。

ラット抗Thy1腎炎におけるメグシンmRNA発現亢進を、さらに2つの別個の実験動物群においてノーザンプロット分析によって再確認した。

ノーザンプロットを実施するために、処理前（0日）、処理後の2、4、8、14および28日目に腎臓を摘出した。各時点で6匹のラットを安楽死させ、このセットの実験を2回実施した。糸球体を分離するために篩別法(Salant DJ, et al., J.Clin.Invest., 66:71-81, 1980)により一方の腎臓を細切し、ISOGEN（ニッポンジーン製）を使用して単離した糸球体からRNAを精製した。

詳しくは、各時点でラットから単離したRNAを合わせ、10 $\mu$ gの総RNAを電気泳動によって、2.2mol/Lホルムアルデヒド変性ゲルを含有する1%アガロース中で分離し、次にニトロセルロースフィルターにキャピラリートランスファーした。プローブとして、クローン27.2cのラット・メグシンの部分cDNAを使用した。膜を65°Cで3時間Rapid Hyb（アマシャム製）溶液中でハイブリダイゼーションした。プロットを60°Cで最終ストリンジエンシーである0.1×SSC/0.1%SDS中で洗浄した。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記のように実施した。デハイブリダイゼーション後に実施した $\beta$ -アクチンプローブを用いた同じ膜のその後のノーザンプロット分析は、各レーンに等しい量のRNAが適用されていることを確認した。

- 3 7 -

代表的なノーザンプロットの写真を図6に示す。メグシン mRNA の発現は基底レベルでは検出されなかったが、長時間露出することによって8日目にだけメグシンのわずかなバンドが検出された。これは半定量 RT-PCR によるデータを裏付けるものである。メグシンのバンドは他のどの時点においても観察されなかった。

#### 〔実施例10〕免疫組織化学的分析

蛋白質は、必ずしも mRNA と同じ場所に局在していない。さらに、メグシンは SERPIN スーパーファミリーの一員であり、従って、分泌因子として働く可能性があるが、その標的は未だ不明である。 *in vivo* における生物学的機能を解明するためには、腎臓におけるメグシン蛋白質の発現および局在を検討する必要がある。従って、本発明者らは、ラットメグシンの合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を形成し、免疫組織化学的方法によってメグシン蛋白質の局在を検討した。抗原性合成ペプチドはラットメグシンの 341～353 アミノ酸に相当し、ヒトおよびげっ歯類の間では保存されているが、SERPIN スーパーファミリーの他のメンバーとは配列の相同性を共有していない。

本発明者らはウェスタンプロット分析を行い、この抗体の特異性を実証した（図7）。抗メグシン抗体は CHO-メグシン（レーン1）、MBP-メグシン（レーン2）と反応したが、MBP（レーン3）またはKLH（データは示していない）とは反応しなかった。組換えメグシンに対する抗体の結合は、非特異的結合を反映しなかった。その理由は、免疫反応が過剰量の合成メグシンペプチド（レーン4～6）の存在下では完全に阻害され、また、免疫したウサギの免疫形成前ウサギ IgG（レーン7～9）では免疫反応は観察されなかったからである。

#### 〔実施例11〕抗 Thy1 腎炎モデルラット由來の腎組織を用いた免疫組織学的検討

抗 Thy1 腎炎における一時的なメグシン発現プロフィールを検討するために、先に記載されているように（Nangaku M., et al., J.Am.Soc.Nephrol., 10:2323-2331, 1999）、間接的な免疫ペルオキシダーゼ方法をメチルカルノイ（methyl

Carnoy' s)固定組織にて施行した。詳しくは、増殖細胞核抗原 (PCNA) に対する抗体であるマウスモノクローナル抗体 PC10 (DAKO A/S , Denmark) で染色し、糸球体細胞増殖を評価した。メサンギウム細胞活性化は、 $\alpha$ -平滑筋アクチンに対する抗体であるマウスモノクローナル抗体 1A4 (Sigma, St. Louis, MO) で染色し評価した。

処理組織を、4 $\mu$ mの切片を過ヨウ素酸シッフ試薬で染色し、ヘマトキシリンで二重染色した。糸球体断面あたりの糸球体細胞数および増殖中の細胞数を盲検的に計数した。無作為に選抜したラット 1 頭当たり 30 個の糸球体を検討し、糸球体あたりの平均細胞数を算出した。ごく少量 (断面あたり < 20 別個の毛細管セグメント) の糸球体ふさ状分岐(glomerular tuft) しか含有しない糸球体断面は使用しなかった。

$\alpha$ -平滑筋アクチンの染色作用を評価するために、各糸球体を半定量的に段階わけした (Yoshimura A., et al., J.Am.Soc.Nephrol., 9:2027-2039, 1998) : 0 ; 染色なし、1 ; 1~25%の糸球体ふさ状分岐のメサンギウム染色、2 ; 陽性の染色を示す 25~50%の糸球体ふさ状分岐、3 ; 陽性の染色を示す 50~75%の糸球体ふさ状分岐、4 ; >75%の糸球体ふさ状分岐が強く染色されている。

詳しくは、2 日目にメサンギウム溶解 (mesangiolysis) により糸球体細胞が減少したことが分かった (糸球体あたり 59.3 $\pm$ 1.9 細胞対 0 日目の 78.3 $\pm$ 2.0)。その後、4 日目 (69.5 $\pm$ 3.2) および 8 日目 (92.6 $\pm$ 2.9) には総細胞が増加した。28 日目には糸球体細胞数は基底レベルに戻った (76.5 $\pm$ 3.4)。糸球体における  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現は、最初は OX-7 注射後 4 日目に見られ (1.6 $\pm$ 0.2)、8 日目に増加した (3.4 $\pm$ 0.2)。28 日目の糸球体でも  $\alpha$ -平滑筋アクチンの低レベルの発現が観察された (1.3 $\pm$ 0.2)。糸球体細胞増殖は 2 日目に増加し (糸球体あたり 7.7 $\pm$ 3.3 PCNA 陽性細胞対 0 日目の 0.9 $\pm$ 0.2)、4 日目にピークに達し (18.6 $\pm$ 2.2)、8 日目まで高い値を維持し (14.3 $\pm$ 2.0)、28 日目に正常に戻った (1.4 $\pm$ 0.4)。

- 3 9 -

### 〔実施例 1 2 〕 免疫組織化学分析

免疫組織化学分析を実施するために、実施例 8 と同じく腎臓を摘出し、OCT (Lab-Tek Products, Miles Laboratories, Naperville, IL) に包埋し、液体窒素を用いてアセトン中ですばやく凍結して凍結切片を得た。

ラット腎組織試料を  $4\mu\text{m}$  に切片化し、4%パラホルムアルデヒドを PBS に加えたもので固定した。PBS で洗浄後、切片を等級エタノールで脱水し、0.3%H2O2 を添加したメタノール中で室温において 20 分間インキュベーションし、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。0.25%Tween20 を含有する PBS で 3 回洗浄後、切片を室温においてブロッキングバッファー (Block AceTM, Snow Bland Tokyo, Japan) と共にブレインキュベーションし、次に免疫化したウサギのウサギ抗ラットメグシン IgG または免疫前血清 IgG と共に 4°Cにおいて 1 晩インキュベーションした。次いで、切片を 50 倍希釈したペルオキシダーゼ抱合ブタ抗ウサギ抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) と共に室温において 30 分間インキュベーションし、0.03%H2O2 を含有する 3'3-ジアミノベンジジン四塩酸で展開し、次にヘマトキシリソで二重染色した。過剰量の合成ラットメグシンペプチド P2 と共にインキュベーションしておいた抗メグシン抗体を使用して免疫染色の特異性を確認するための競合実験を実施した。

結果、ラット糸球体にメグシン蛋白質の局在的な蓄積が観察されたが (図 8 B) 、肝臓、脾臓および肺を含む他の器官では陰性であった (データは示していない)。メグシンの沈着は主にメサンギウム領域に観察された。疾患が誘発される前の 0 日目では、メグシン陽性細胞は、あらゆる時点における対照動物と同様に少なかった (データは示していない)。メグシンの染色は 2 日目でもわずかで、これはおそらくメサンギウム溶解 (mesangiolysis) が進行しているためと考えられる。メグシンの蓄積は 4 日目にわずかに亢進し、8 日目に最も顕著であった。メグシン沈着が増加すると、糸球体上皮細胞の一部も陽性染色を示した。メグシン沈着の増加は 14 日目にも明らかであったが、28 日目には正常に戻った。免疫

- 4 0 -

前血清を使用した場合、または抗体を過剰量のメグシンペプチドとブレインキュベーションした場合には、染色は陰性であった（図 8A）。

#### 〔実施例 13〕 免疫蛍光学的検討

メグシンとメサンギウム細胞活性化との関連をさらに検討した。

本発明者らは、メグシンとメサンギウム細胞活性化のマーカーである  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現局在を同定するために、抗メグシン抗体および抗  $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体を用いて、一連の切片の免疫組織染色を行った。4  $\mu\text{m}$  に切片化した凍結腎組織を、4%パラホルムアルデヒドを PBS に加えたもので固定し、 $\alpha$ -平滑筋アクチンの検出は、FITC-標識した 1A4 モノクローナル抗体（Sigma）を使用した。ラットメグシンを検出するためには、FITC-標識したブタ抗ウサギ IgG（Dako）を 50 倍希釀で使用した。

メグシンは、主に、 $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性領域に局在していたが、その領域以外にも観察された（図 9）。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎の診断が可能となつた。ラットのメサンギウム増殖性腎炎は、たとえば生殖発生毒性試験のような人為的に引き起こされる腎機能障害の代表的なものである。ラットは、実験動物としては生理的にヒトに近いと言われている。加えて本発明においては、ヒトにおける腎機能の指標となるメグシンのラットにおけるホモログが、メサンギウム増殖性腎炎のマーカーとして有用であることを見出した。したがって、ラットにおけるメグシンの挙動は、そのままヒトに外挿することができると考えられ、メグシンを指標とする毒性試験の価値を飛躍的に高めるものと言うことができる。

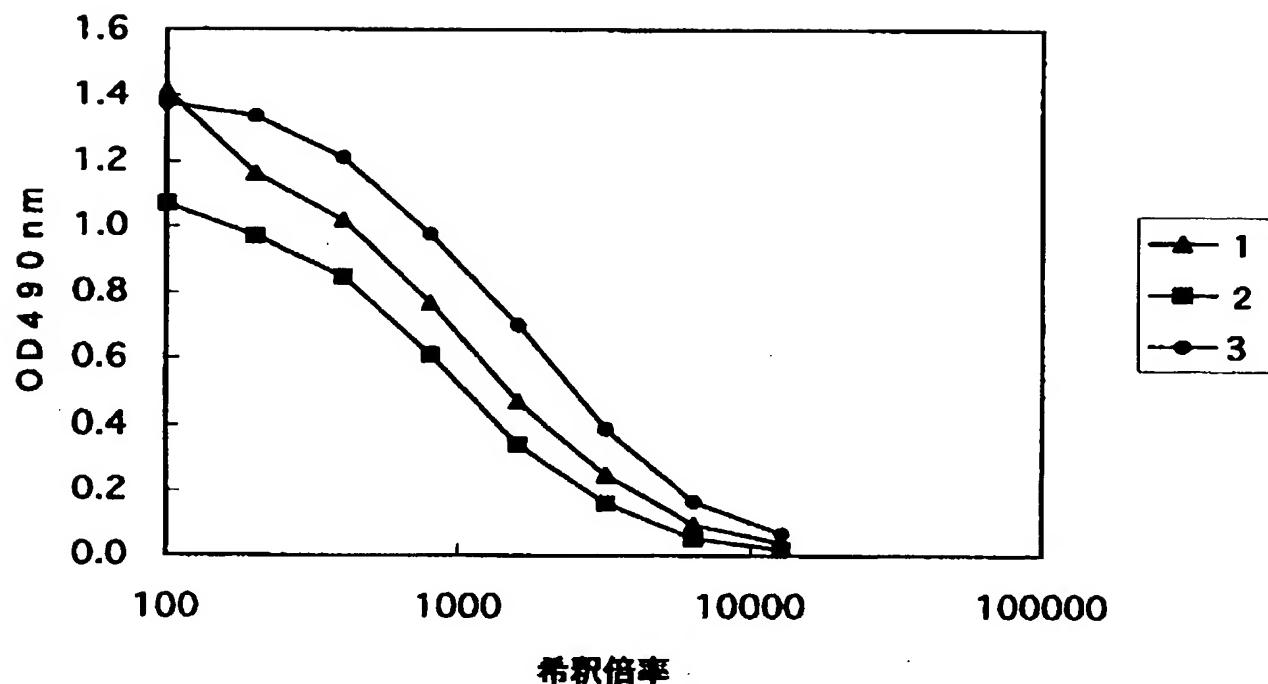
- 4 1 -

### 請求の範囲

1. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体。
2. モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
3. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含むペプチドと、アジュバントを含む組成物。
4. ラット由来の生体試料中のメグシンタンパク質を、請求項1に記載の抗体と反応させ、抗原抗体反応の生成物を検出する工程を含むラット・メグシンの測定方法。
5. 請求項1に記載の抗体を含む組成物。
6. 抗体が標識されているか、または担体に固定化されている請求項5に記載の組成物。
7. 以下の工程を含む、ラットにおけるメサンギウム増殖性腎炎を診断する方法。
  - a) 被検ラット由来の生体試料中のラット・メグシンタンパク質を、請求項1に記載の抗体と反応させ、抗原抗体反応の生成物を検出する工程、および
  - b) 正常ラットのラット・メグシンの測定値と比較してラット・メグシン測定値が高い場合にメサンギウム増殖性腎炎と診断する工程、
8. 被検ラットのメグシン測定値を経時的に観察することによって、メサンギウム増殖性腎炎の病態の悪化または改善をモニタリングする請求項7に記載の方法。
9. 請求項1に記載の抗体の、ラットのメサンギウム増殖性腎炎の診断剤の製造における使用。
10. 請求項1に記載の抗体の、ラットのメサンギウム増殖性腎炎の診断における使用。

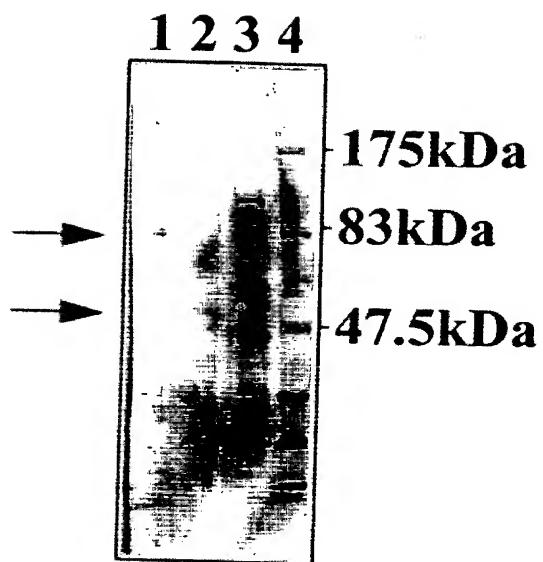
1 / 9

図 1



2 / 9

図 2



3 / 9

図 3

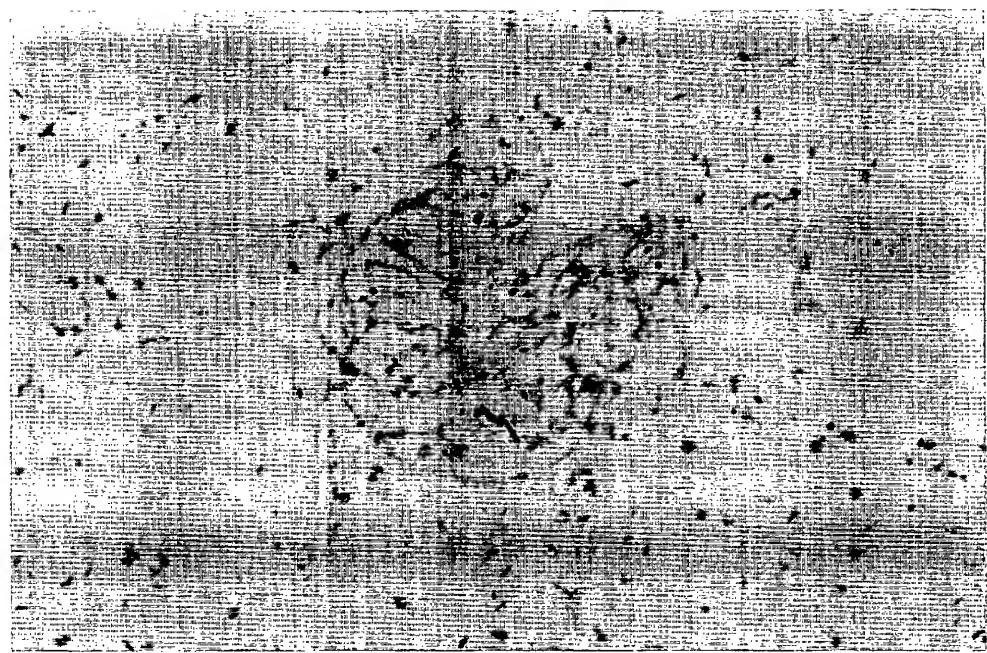
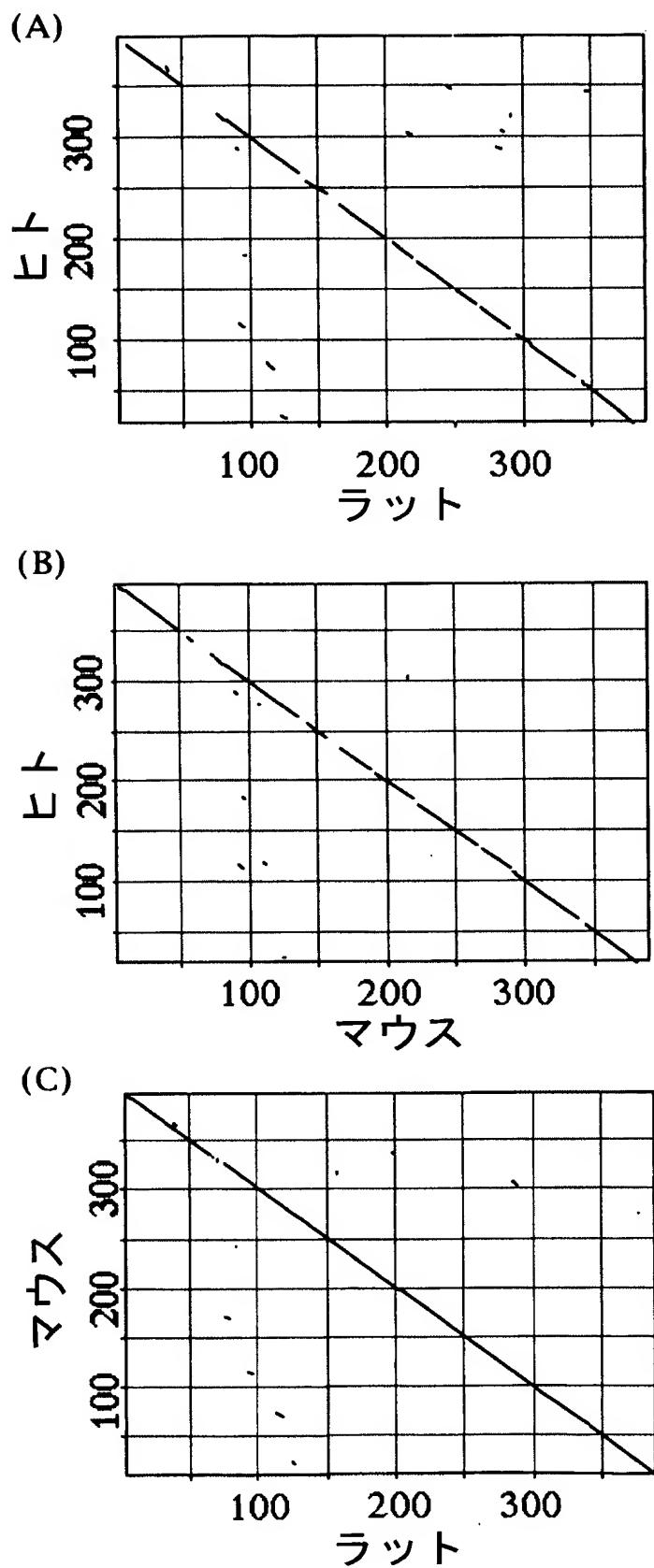
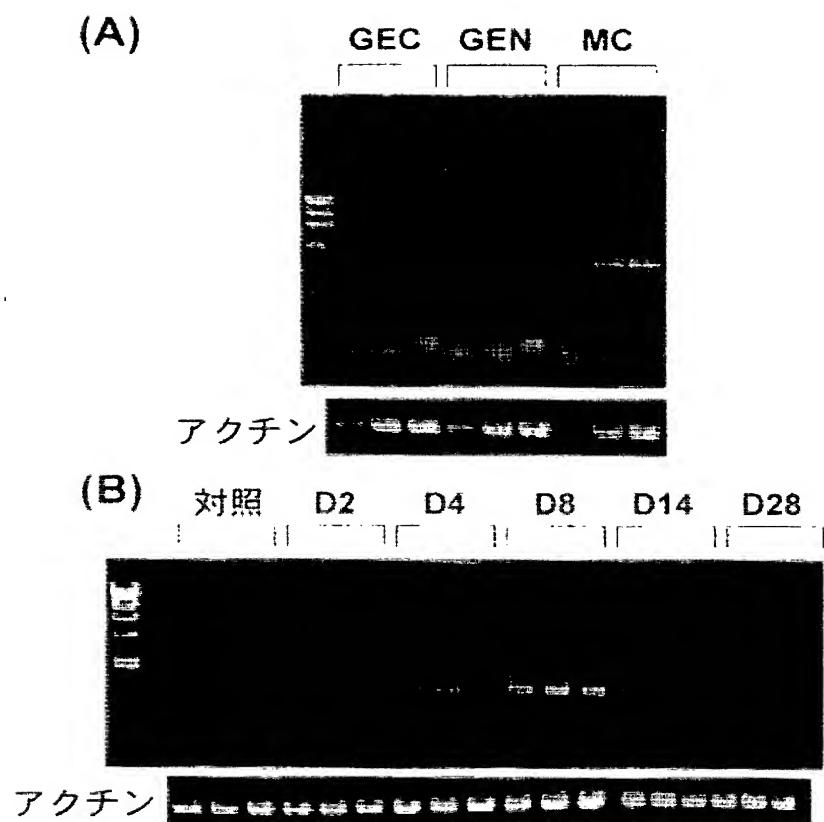


図 4



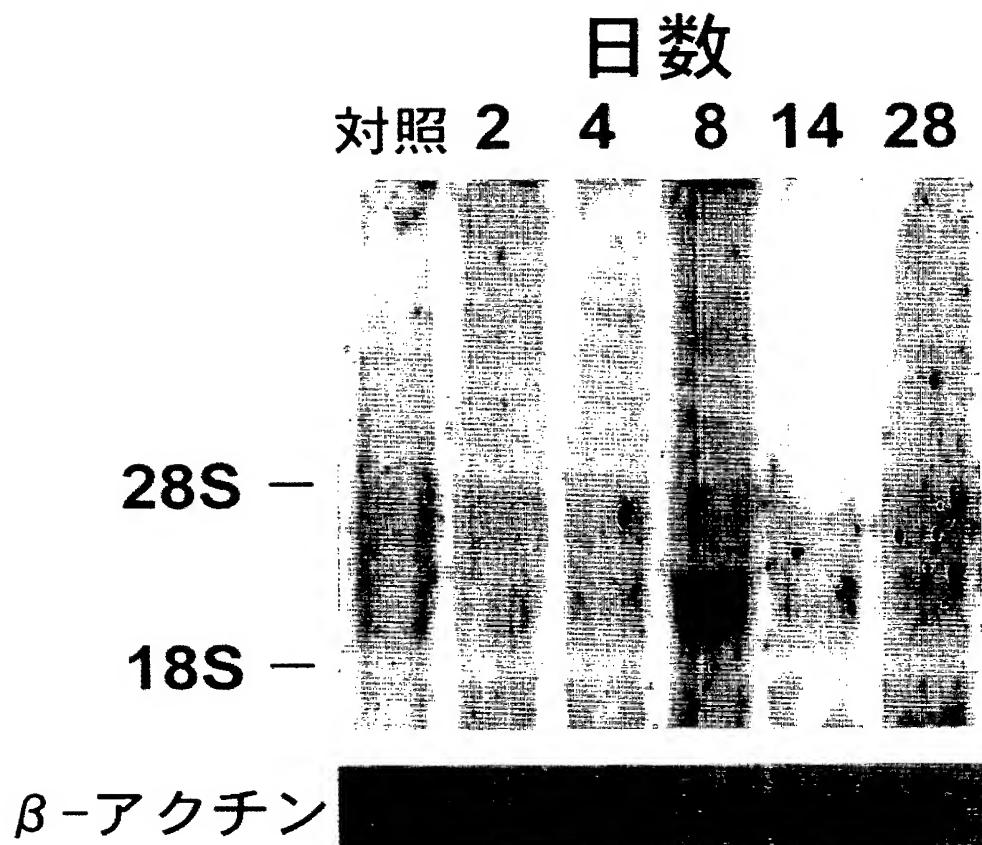
5 / 9

図 5



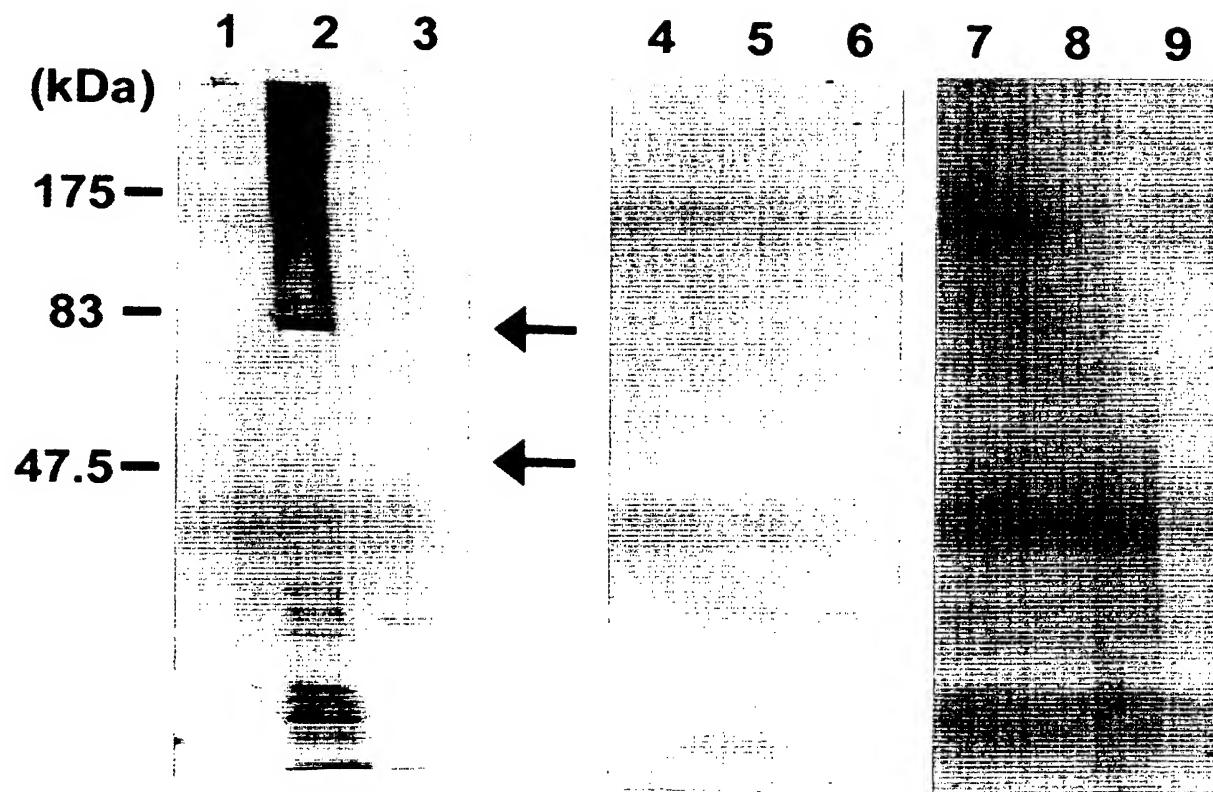
6 / 9

図 6



7 / 9

図 7



8 / 9

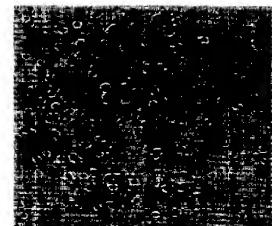
図 8

(A)

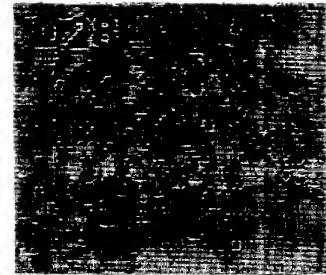
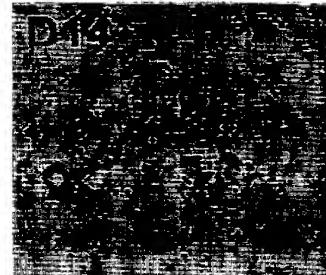
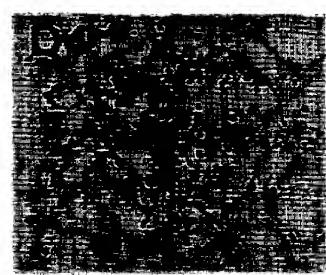
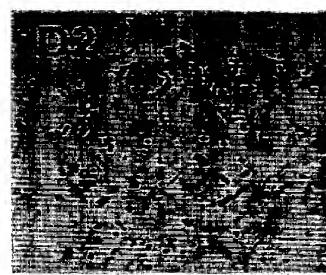
競合なし



競合あり

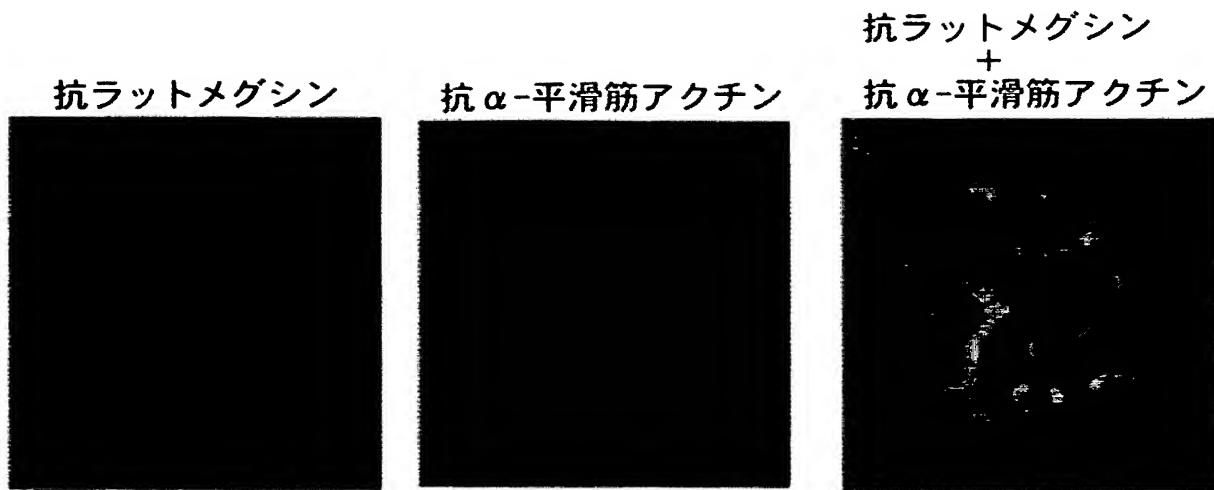


(B)



9 / 9

図 9



## SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio  
KUROKAWA, Kiyoshi

<120> Method for Diagnosing of Rat Mesangial nephritis.

<130> F2-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-373677

<151> 1999-12-28

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(1147)

<400> 1

tttcaaaa atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac 49  
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp  
1 5 10

tta ttc aga gag atg gat agt agt caa gga aac gga aat gta ttc ttc 97  
Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe  
15 20 25 30

tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg agc cta atc cgt ttg ggt gct 145  
Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala  
35 40 45

cga ggt gac tgt gca cgt cag att gac aag gcc ctg cac ttt atc tcc 193  
Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser  
50 55 60

cca tca aga caa ggg aat tca tcg aac agt cag cta gga ctg caa tat 241  
Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr

65	70	75	
caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat tat			289
Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Tyr			
80	85	90	
gaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt			337
Glu Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe			
95	100	105	110
cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg			385
His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val			
115	120	125	
gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att			433
Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile			
130	135	140	
aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg			481
Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu			
145	150	155	
ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct			529
Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala			
160	165	170	
gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tcg gcc ttc acc aag agt gat acc			577
Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr			
175	180	185	190
ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat			625
Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn			
195	200	205	
atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca			673
Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro			
210	215	220	
cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac			721
Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr			
225	230	235	
atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt			769
Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser			
240	245	250	
ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag			817
Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln			

255	260	265	270	
tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa				865
Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu				
275	280	285		
atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag				913
Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu				
290	295	300		
tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta				961
Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val				
305	310	315		
tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc				1009
Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr				
320	325	330		
gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct				1057
Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro				
335	340	345	350	
gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg				1105
Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg				
355	360	365		
aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct				1147
Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro				
370	375	380		
tgaaattcta ttgggtttc catacaactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag				1207
aattgttaatt ggaagtacat gg				1229
<210> 2				
<211> 380				
<212> PRT				
<213> Rattus norvegicus				
<400> 2				
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe				15
1	5	10		
Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser				30
20	25			
Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly				

35	40	45	
Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp	Lys Ala Leu His Phe Ile Ser	Pro Ser	
50	55	60	
Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr Gln Leu			
65	70	75	80
Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Tyr Glu Leu			
85	90	95	
Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe His Lys			
100	105	110	
Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg			
115	120	125	
Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys			
130	135	140	
Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp			
145	150	155	160
Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr			
165	170	175	
Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr Leu Ser			
180	185	190	
Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn Met Met			
195	200	205	
His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro Pro Met			
210	215	220	
Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met			
225	230	235	240
Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln			
245	250	255	
Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val			
260	265	270	
Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu Met Arg			
275	280	285	
Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu Ser Arg			

290 295 300  
Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys  
305 310 315 320  
Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala  
325 330 335  
Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser  
340 345 350  
Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asn  
355 360 365  
Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro  
370 375 380

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<400> 3

Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser Thr Val  
1 5 10

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 4

agaatttggc ttcgacttat tcagagagat gg

32

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 5

atgacagctg atgagctgag gctgctgtcc ccc

33

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 6

gtgtgatgggt gggttatgggt cagaaggact

30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

atggcatgag ggagcgcgtta accctcatag

30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; n indicates a, t, g or c.

&lt;400&gt; 8

gtgaatgctg tgtacttaaa ggcaantgn

29

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; n indicates a, t, g or c.

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; r indicates a or g.

&lt;400&gt; 9

aanagraang grtcngc

17

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; n indicates a, t, g or c.

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; y indicates c or t.

&lt;400&gt; 10

atggcncntcng cngcngcngc naaygc

26

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially

## synthesized primer sequence

<400> 11  
cgacacctccag aggcaattcc agagagatca gccctgg 37

<210> 12  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12  
gtcttccaag cctacagatt tcaagtggct cctc 34

<210> 13  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 13  
gctcagggca gtgaagatgc tcagggaga 30

<210> 14  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 14  
ctgacgtgca cagtcacctc gagcacc 27

<210> 15  
<211> 36  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

gagggtctcag aagaaggcac tgaggcaact gctgcc

36

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

ctctatagga gacacttgg

19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

gaaacacaatc aaagcaaac

19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09251

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, C12N15/06, G01N33/53, 33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/00-16/46, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)  
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
PIR/SWISSPROT/GENESEQ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 00/57189, A1 (FUSO PHARM IND LTD), 28 September, 2000 (28.09.00) & AU, 0031941, A	1-10
X	WO, 99/15652, A1 (MIYATA T), 01 April, 1999 (01.04.99) & EP, 1018551, A1 & AU, 9890963, A	1-10
A	J. Clin. Invet., 102(4), p.828-836, 1998 Toshio Miyata et al., "A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin upregulated in IgA nephropathy"	1-10
A	EP, 583884, A1 (Suntory Ltd.), 23 February, 1994 (23.02.94) & JP, 6-313000, A	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 March, 2001 (16.03.01)Date of mailing of the international search report  
27 March, 2001 (27.03.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C07K16/18, C12N15/06, G01N33/53, 33/573

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C07K16/00-16/46, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)  
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
PIR/SWISSPROT/GENESEQ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/57189, A1 (FUSO PHARM IND LTD) 28. 9月. 2000 (28. 09. 00) &AU, 0031941, A	1-10
X	WO, 99/15652, A1 (MIYATA T) 1. 4月. 1999 (01. 04. 99) &EP, 1018551, A1 &AU, 9890963, A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 03. 01

国際調査報告の発送日

27.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子



4B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J.Clin. Invet., 102(4), p. 828-836, 1998 Toshio Miyata et al., "A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin upregulated in IgA nephropathy"	1-10
A	E P, 583884, A1 (Suntory Ltd.) 23. 2月. 1994 (23. 02. 94) & J P, 6-313000, A	1-10